



ムラサキイガイリゾチームにおける活性の季節変動と遺伝子の発現

著者	齋藤 彩華
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/34631

平成 19 年度修士論文

ムラサキイガイリゾチームにおける 活性の季節変動と遺伝子の発現

平成 20 年 1 月 18 日

東北大学大学院 資源生物科学専攻

水圏動物生理学研究室

指導教員 高橋計介准教授

学籍番号 A6AM1119

氏名 齋藤 彩華

[目次]

第1章 序論	・・・3
第2章 ムラサキイガイリゾチームにおける活性の季節変動	
目的	・・・5
第1節 外套膜、鰓、および消化盲嚢におけるリゾチーム活性の季節変動	・・・6
第2節 外套膜、鰓、および消化盲嚢におけるタンパク質濃度の季節変動	・・・9
考察	・・・11
図表	・・・14
第3章 ムラサキイガイリゾチームにおける遺伝子の発現	
目的	・・・21
第1節 in situ hybridization を用いた外套膜および消化盲嚢における リゾチーム遺伝子発現部位の検討	・・・22
第2節 血球および消化盲嚢における Real-time PCR によるリゾチーム 遺伝子発現量の測定	・・・26
考察	・・・30
図表	・・・32
要約	・・・43
謝辞	・・・44
参考文献	・・・45

第1章 序論

リゾチーム (Lysozyme: EC 3.2.1.17) はバクテリアから動植物まで、自然界に広く分布する酵素であり、細胞、組織および分泌液中など多様に存在している。現在、リゾチームは、ファージ、バクテリア、植物 (p)、ニワトリ (c)、ガチョウ (g)、無脊椎動物 (i) の6つのタイプに分類されている。どのタイプのリゾチームも、グラム陽性菌の細胞壁成分であるN-アセチルムラミン酸 (MurNAc) とN-アセチルグルコサミン (GlucNAc) 間の β -1,4結合を加水分解する働きをもつことが特徴である (Jolles and Jolles, 1984)。溶菌酵素という特性の点から、リゾチームは細菌感染に対する生体防御因子としての働きを持つと考えられている (Bachali et al., 2002)。

脊椎動物とは異なり獲得免疫をもたない無脊椎動物にとって、リゾチームは大変重要な生体防御因子であると考えられる。無脊椎動物であるヨーロッパの医療用ヒル *Hirudo medicinalis* のデスタビラーゼでは、溶菌という酵素的手段だけでなく、熱を加えたリゾチームでも抗菌作用があることが報告されており、非酵素的手段によっても生体防御に関わっているということも考えられる (Zavalova et al., 2006)。

リゾチームの生体防御因子としての重要性に関して、軟体動物の二枚貝類でも、他の無脊椎動物と同様に生体防御において重要な役割を担っていると考えられている (Chu, 2000)。二枚貝類のリゾチームは、グラム陽性菌である *Micrococcus luteus* (*lysodeikticus*) を溶菌するだけでなく、グラム陰性菌である *Escherichia coli* や他数種の細菌も溶菌することが、バージニアガキ *Crassostrea virginica* やオーロラニシキガイ *Chlamys islandica* のリゾチーム様酵素であるクラミジンで知られている (Rodrick and Cheng, 1974; Nilsen et al., 1999)。

二枚貝類のリゾチームに関して、近年、遺伝学的手法や分子学的手法を用いた研究が進んできている。産業種として重要なカキ類についてみると、バージニアガキの血リンパにおいてカキ類で初めてリゾチームの精製に成功した (Xue et al., 2004)。バージニアガキの他、日本で食用として重要なマガキ、イガイ類であるヨーロッパイガイ *Mytilus edulis* でそれぞれ複数のリゾチームが発見され、その遺伝子配列や分子特性が示されている (Xue et al., 2007; Matsumoto et al., 2006; Itoh and Takahashi, 2007; Olsen et al., 2003)。

従来は一つのリゾチームが複数の働きを持つと考えられていたが、複数のリゾチームが発見されたことにより、それぞれのリゾチームがどう機能しているのか、どのように関わり合っているのかなどの検討が必要になってきた。また、二枚貝類のリゾチームの働きに関して、カリフォルニアイガイ *Mytilus californianus* で細菌のみを餌として一定期間成長させることができたという報

告があり、生体防御としてだけでなく消化酵素としてのリゾチームの重要性が示唆されている (McHenery et al., 1986)。すなわち、リゾチームは生体防御因子と消化酵素、あるいは未知の機能を有すると考えられ、それらは活性の発現する時期や組織の違いによると考えられる。

本研究ではムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* を研究対象として、リゾチームの活性の変動と遺伝子の発現について検討した。ムラサキイガイにおけるリゾチームの存在はすでに報告されている (高橋ら, 1986)。最近の研究で見つかったヨーロッパイガイの複数のリゾチームは、晶桿体に 3 種類、他の軟体部に 1 種類とされ、それぞれのリゾチームの分子特性の違いも示された (Olsen et al., 2003)。ムラサキイガイにおいても同様に、複数のリゾチーム分子が存在する可能性は高いが、まだ明らかとはなっていない。また、組織ごとに活性の変動やそこから推測される機能の違いについての検討も不十分である。

こうした背景から、ムラサキイガイにおいて、リゾチームがどの組織でどのように働いているのか、リゾチーム分子は複数であるのかを検討することは重要である。本研究では、そうしたムラサキイガイのリゾチームに関する基礎的知見を得ることを目的とし、ムラサキイガイにおけるリゾチーム活性の季節変動の把握とリゾチームの遺伝子発現部位の検討を行った。

具体的には、第 2 章では、外套膜、鰓、および消化盲嚢の 3 つの組織を対象とし、それぞれの組織におけるリゾチーム活性の季節変動を調査し、リゾチームの機能について推定した。

第 3 章では、本研究の遂行中に、本分野の伊藤が同定した 2 つのリゾチーム遺伝子について、それぞれの遺伝子発現部位を、in situ hybridization の手法を用いて検討した。さらに、それぞれの遺伝子における量的な違いを、Real-time PCR によって測定した。

第2章 ムラサキイガイリゾチームにおける活性の季節変動

目的

ムラサキイガイのリゾチームの基礎的知見について、至適 pH は 5.5、至適温度は 60℃であり、消化盲嚢、晶桿体、外套膜、および鰓で活性が認められていることはわかっている（高橋ら，1986）が、その他のことはわかっていない。第1節では、季節により水温やムラサキイガイの生理状態が変化することを考慮し、一年を通してリゾチーム活性がどのように変化するか、温度により活性は異なるのかどうかを調査することにし、ムラサキイガイの外套膜、鰓、および消化盲嚢の3つの組織を対象とした。

第2節では、ムラサキイガイの体内のタンパク質中において、リゾチームはどれくらいの量を占めているのか、タンパク質濃度とリゾチーム活性の変動に共通項があるのかどうかを検討した。2005年5月から2006年5月までの一年を通して、ムラサキイガイのタンパク質濃度の季節変化を毎月測定した。

第1節 外套膜、鰓、および消化盲嚢における

リゾチーム活性の季節変動

材料と方法

実験材料

2005年5月から2006年5月まで、宮城県牡鹿郡女川町竹ノ浦地先（最低水温 5.0℃～最高水温 23.0℃）で天然のムラサキイガイ（平均殻高 69.2 mm）を毎月 5 個体採取した。個体測定を行った後、軟体部を摘出し、-80℃で凍結保存し順次実験に用いた。

実験方法

解剖

凍結保存しておいたムラサキイガイの軟体部を常温で解凍し、解剖用のハサミとピンセットを用いて外套膜、鰓、および消化盲嚢を切り出した。

組織液抽出

各々の組織の湿重量を測定後、解剖用ハサミで組織を細かく切り分けて、ガラスホモジェナイザーに入れ、湿重量の 5 倍量（weight / volume）の酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液（CH₃COOH/CH₃COONa pH 5.0）を加えてホモジェナイズし、これを遠心分離（27,000×*g*, 4℃, 30 分間）して上清を得た。

上清には脂肪分や組織屑が含まれており、濁りの程度が著しく吸光度測定が困難な場合は孔径 5 μm のメンブレンフィルターに上清を通した。

リゾチーム活性測定

Micrococcus luteus 乾燥菌体（生化学工業）を Sorensen リン酸緩衝液（1/15 M Na₂HPO₄, 1/15 M KH₂PO₄, pH 7.0）に 1 mg/ml となるように懸濁し、リゾチームの基質溶液を作製した。

試料上清 100 μl と基質溶液 200 μl を混合し、材料のムラサキイガイを採集した海域の夏季における最高水温の 25℃(Fig.2)と一般的な酵素活性測定温度の 37℃(Fig.3)の 2 温度で 30 分間反応した後、濁度の減少を、マイクロプレートリーダー（Model 450, BIO-RAD）を用いて 540nm における吸光度で測定した。コントロールとして、リン酸緩衝液のみと反応させた菌液を用いた。

また、濁度の減少量は、反応前（0 分）と 30 分反応後の吸光度の差とした。

定量

標品のニワトリ卵白リゾチームをリン酸緩衝液に溶解し、吸光度を測定して標準曲線を作製した。(Fig.1a, 1b)これに試料の吸光度を照合してリゾチーム活性量を算出した。

結果

測定した3つの組織のすべてでリゾチーム活性が検出された。

25℃(Fig.2)と37℃(Fig.3)という反応温度の違いを調べた結果、3つの組織とも全季節において25℃の方がリゾチーム活性は高かった。

組織ごとの季節変動は、2つの反応温度においてほとんど同じ変動傾向であったが、消化盲嚢の2005年6月と2006年5月のサンプル、鰓の2月のサンプル、外套膜の1月のサンプルで、25℃と37℃で逆の傾向を示していた(Fig.4a~c)。

組織ごとの活性を比較すると、消化盲嚢で最も高く、次いで鰓で高く、外套膜で最も低かった(Fig.2, Fig.3)。消化盲嚢は、25℃で11月に最も高い $29\mu\text{g/g}$ を示し、2005年5月に最も低い $10.7\mu\text{g/g}$ を示した。37℃では同じく11月に最も高い $20.2\mu\text{g/g}$ を示し、6月に最も低い $6.3\mu\text{g/g}$ を示した。鰓は、25℃で3月に最も高い $14.9\mu\text{g/g}$ を示し、6月に最も低い $6.6\mu\text{g/g}$ を示した。37℃では12月に最も高い $8.9\mu\text{g/g}$ を示し、同じく6月に最も低い $3.0\mu\text{g/g}$ 以下を示した。外套膜は、25℃では1月と3月に最も高い $9.2\mu\text{g/g}$ を示し、8月に最も低い $3.2\mu\text{g/g}$ を示した。37℃では12月に最も高い $5.3\mu\text{g/g}$ を示し、2005年5月、6月、8月、9月、10月に最も低い $3\mu\text{g/g}$ 以下を示した。

組織ごとの季節変動は、消化盲嚢では5月~7月にかけて上昇し9月にかけて低下した後、また冬に上昇し、2月~5月の春にかけて低下している。他の2組織と比較して消化盲嚢では年間を通して全体的に高い活性を保持していた。鰓では6月~8月にかけて上昇、9月に一旦低下したのち12月にかけて上昇し、1月に低下した後また3月に上昇し、その後低下する傾向が見られた。外套膜では5月~7月にかけて上昇した後8月~10月にかけて低下し、1月にかけて大きく上昇し2月に一旦低下して3月にまた上昇する傾向が見られた。

第2節 外套膜、鰓、および消化盲嚢における

タンパク質濃度の季節変動

材料と方法

実験材料

−30℃で凍結保存していたリゾチーム活性測定用の試料上清の一部をタンパク質濃度の測定に用いた。

実験方法

Bradford 法に基づくタンパク量測定キット (Bio-RAD) を用いた。

タンパク染色液であるプロテインアッセイ液を精製水で 5 倍希釈し、反応液を作製した。この反応液 1 ml に対し、試料上清を 20 μ l 混和し、60 分以内にマイクロプレートに 200 μ l ずつ分注して 595 nm における吸光度の変化を測定した。陰性対照として、Oyster BSS と反応液のみを混合させたものを用いた。

タンパク量の定量を行うため、既知濃度のスタンダード I (ウシ γ グロブリン) を Oyster BSS を用いて段階的に希釈し、その吸光度を測定して標準曲線を作製した。この曲線に試料の吸光度を照合してタンパク質濃度を算出した。

結果

組織液中のタンパク質濃度は、年間を通して消化盲嚢で最も高かった。9月と12月を除くと次いで外套膜で高く、鰓で最も低かった(Fig.6)。3組織に共通して9月に最もタンパク質濃度が高かった。外套膜では当てはまらないが、消化盲嚢と鰓では9月に最も高く、10月、11月に低下した後12月に再度高くなり、1月に低下する傾向が見られた。

また、タンパク質濃度中のリゾチーム量を算出すると、25℃と37℃でそれぞれ、外套膜で0.03%と0.019%、鰓で0.06%と0.03%、消化盲嚢で0.03%と0.02%といずれも低い値であった。

考察

今回測定した 3 つの組織ともリゾチーム活性が検出された。これまで測定された数々の二枚貝においても、いろいろな組織で活性が検出されている (Rodrick and Cheng, 1974; 高橋ら, 1986; McHenery et al., 1986; Olsen et al., 2003)。全体的な活性の強さ、組織ごとの活性の強さは種によって異なるが、今回測定した外套膜、鰓、消化盲嚢においてはリゾチーム活性が検出されているものが多い。

25℃と 37℃で反応させて得られたリゾチーム活性値は、3 組織とも全季節において 25℃で高かった。過去の高橋ら (1986) の報告では、ムラサキイガイリゾチームの至適温度は 60℃とされており、37℃よりも 25℃で活性が高いという今回の結果は過去の報告と異なっていた。二枚貝の一種であるオーロラニシキガイのリゾチーム様酵素であるクラミジンは、22℃前後で最大活性を持ち、4℃と 37℃で同様の活性を持つ低温で活性が高い酵素である (Nilsen et al., 1999)。また、最近ヨーロッパイガイにおいてリゾチームは数種類存在するという報告があり (Olsen et al, 2003)、クラミジンのような低温性のリゾチームの存在や、数種類のリゾチームが混在している可能性を考慮すると、今回測定したリゾチームは過去に測定された時とは異なり、至適温度の低いリゾチームが多く測定されたなどの可能性も考えられる。

リゾチーム活性を組織別に見ると、消化盲嚢で最も高く、次いで鰓で高く、外套膜で最も低かった。30 種類の二枚貝について、組織ごとにリゾチーム活性を測定した McHenery et al (1986) によれば、ほとんどの種で晶桿体の活性が最も高く、次いで消化盲嚢の活性が高い種が多かった。鰓と外套膜については、種によって活性の高さは大きく異なった。ムラサキイガイと近縁のヨーロッパイガイでは晶桿体の活性が著しく高く、次いで消化盲嚢、外套膜、鰓の順であったが、外套膜と鰓の活性の差は小さく、消化盲嚢の活性はそれらの 10 倍以上であった。高橋ら (1986) もムラサキイガイでの外套膜の活性が鰓より高いことを報告しているが、その差は小さいものだった。今回の結果で、消化盲嚢で活性が著しく高い値を示したことは過去の報告と同様の結果であった。外套膜よりも鰓で活性が高いことは過去の報告と必ずしも一致しなかったが、本研究においてリゾチーム活性を検出した 3 つの組織は、イガイ類におけるリゾチーム活性の高い部位であると考えられる。

ヨーロッパイガイをはじめ多くの二枚貝種において、消化盲嚢や晶桿体で活性が高いことから、リゾチームは消化酵素として働くことが第一義なのではないかと言われている (McHenery et al., 1986)。本研究でも測定した組織中では消化盲嚢の活性が最も高く、また年間を通して高い活性を示しており、この説を支持するものであった。最近、ヨーロッパイガイの晶桿体から 3 種類、消化

盲嚢から1種類の計4つの異なるリゾチーム分子が単離されている(Olsen et al., 2003)。活性の違いは分子種によるものである可能性も考えられるので、ムラサキイガイでも複数のリゾチームがあり、その組織分布が異なることで組織における活性の高さや季節変動が異なるのかもしれない。

季節変動は、組織ごとに多少の違いはあるものの、秋の終わりから春の初めにかけて活性が高い傾向が見られた。これまでもリゾチーム活性は大きな季節変動を示すことが報告されており(Chu and LaPeyre, 1989; Ishikawa et al., 1997; Santarem et al., 1994; Cronin et al., 2001)、主な要因として水温の変動と成熟・放卵放精が考えられている。本研究において高い活性を示した時期は、全体として低水温期であり、冷水性種とされるムラサキイガイにとっては好適な温度条件であった可能性が高い。今回測定対象としたムラサキイガイの3つのリゾチーム活性の変動を調べた例はないが、血リンパリゾチームの変動を見た研究でも全般に低水温期の活性が高かった(Santarem et al., 1994)。もう1つの大きな要因である生殖周期との関係は必ずしも明確ではない。組織標本を見る限り、女川湾のムラサキイガイは10月頃に大きな部分産卵を行なうが、1度では終わらずに1月頃と春の4~5月にも小さな産卵をする型と思われた。これらから推測すると、ムラサキイガイのリゾチーム、特に外套膜のリゾチームは、放卵放精後に高くなる傾向を示し、放卵放精後の卵や精子の処理と産卵後の生理活性による感染の機会の増大を防ぐためであると考えられた。また、組織で逆に見ると、冬の低水温期に、消化盲嚢では活性が低下する傾向があるのに対し、外套膜と鰓では活性が低下せず、むしろ年間で最も活性が高くなる傾向にある。この違いは、組織でのリゾチーム分子の分布の違いや、組織ごとに異なるリゾチーム分子が発現している可能性を示唆している。

また、同時期に同じ女川湾で採取したマガキのリゾチーム活性と比較すると、ムラサキイガイでは37℃よりも25℃で活性が高かったのに対し、マガキでは37℃での活性の方が高く(伊藤, 2005)、両種でリゾチームの性質が異なることが明確に示された。さらに、ムラサキイガイでは消化盲嚢で最も活性が高かったのに対し、マガキでは外套膜で最も活性が高く、消化盲嚢での活性はムラサキイガイよりも17~40倍も低い値であり、両種におけるリゾチームの機能の違いや、特に夏季においてムラサキイガイではリゾチームの消化酵素としての働きが重要であると考えられた。

リゾチーム活性の季節変動と同時期に行なったタンパク質濃度測定の結果、タンパク質濃度は年間を通して消化盲嚢で最も高く、9月と12月を除くと次いで外套膜で高く、鰓で最も低かった。これは3つの組織の構成成分を考慮すれば納得の行く結果であった。タンパク質濃度とリゾチーム活性の季節変動を比較すると、リゾチーム活性の低下する9月にタンパク質濃度は最も高かった。その他の月の変動も、全体的に一致しているとは言い得ない結果であり、リゾチーム活性とタンパク質濃度の変動は一致しないことが今回の結果で示された。

また、タンパク質濃度のうちリゾチームが占める割合は、その活性から、25℃において、外套膜で 0.03%、鰓で 0.06%、消化盲嚢で 0.03%、また 37℃において、外套膜で 0.019%、鰓で 0.03%、および消化盲嚢で 0.02%と推測された。鰓では組織タンパク中のリゾチームの割合がやや多いが、いずれの組織においても全タンパク質の一部を占めるにとどまることから、リゾチームの変動が全体に与える影響はやはり小さいものであると考えられた。

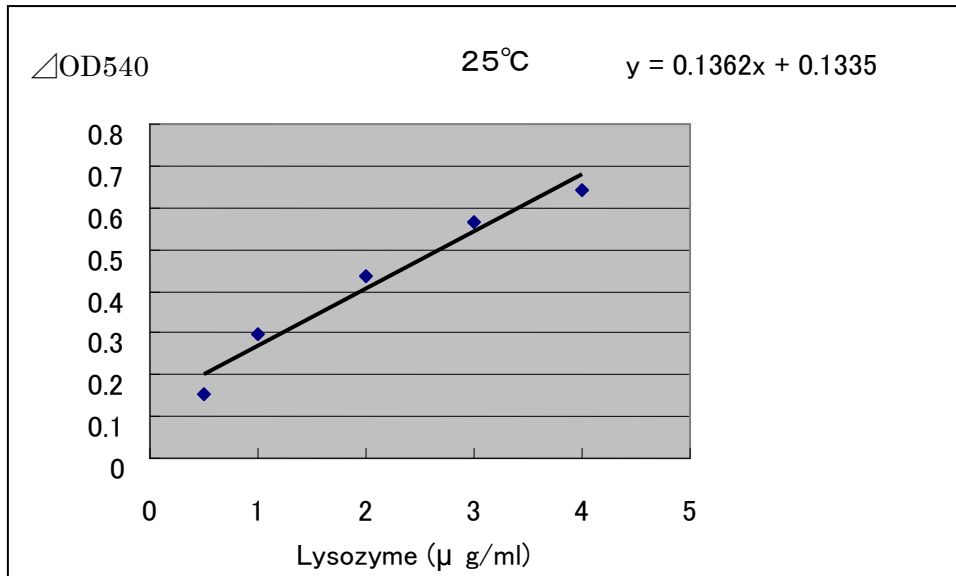


Fig.1a

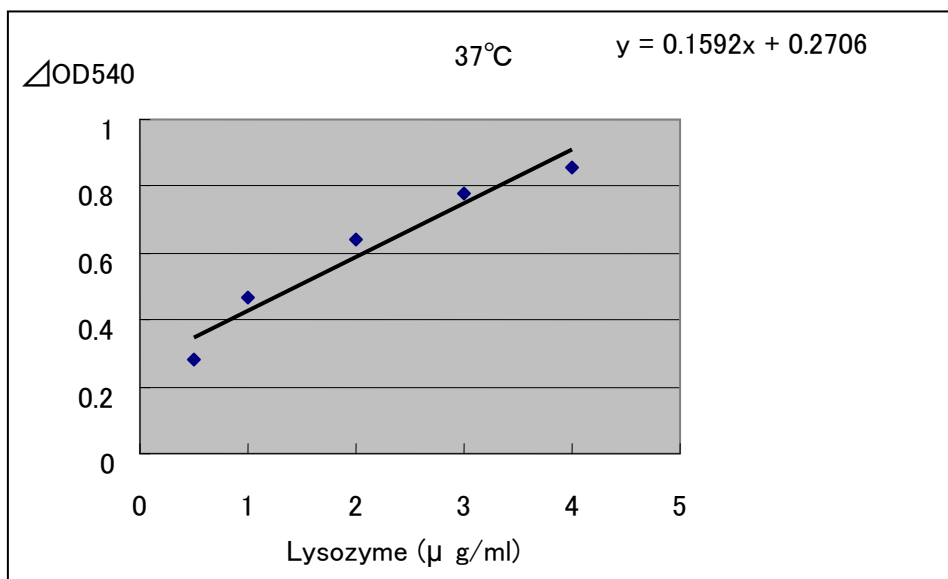


Fig.1b

Fig.1a~b

Standard curve for measurement of lysozyme activity by turbidmetric method with *Micrococcus luteus* as substrate. Hen's egg white lysozyme was used as standard. The mixture of substrate and lysozyme was incubated for 30 min at 25°C(1a) , 37°C(1b) .

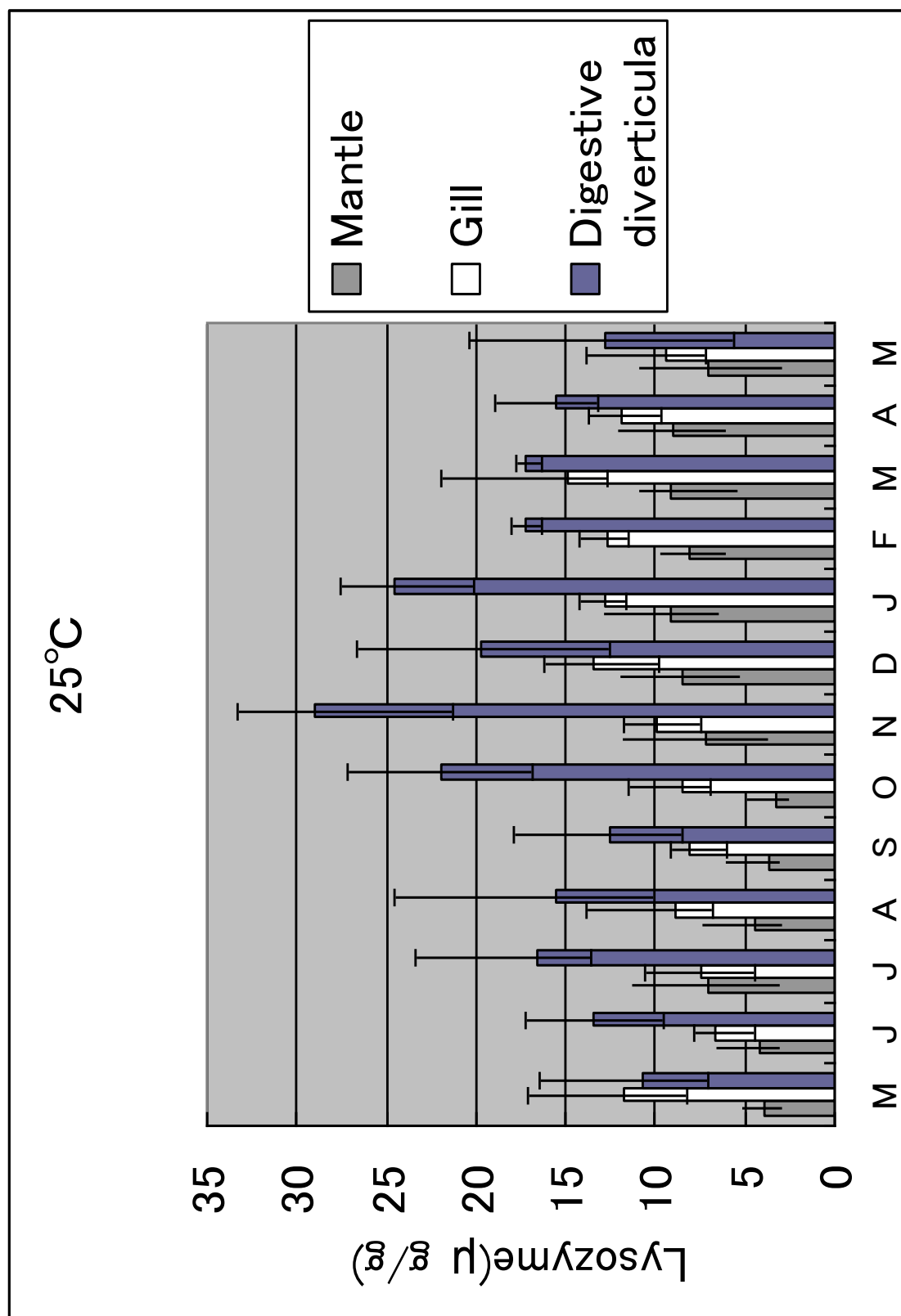


Fig.2 Seasonal changes in lysozyme activity measured at 25°C in the mantle, gill, and digestive diverticula from *Mytilus galloprovincialis* in May, 2005 to May, 2006. Each value shows the mean \pm S.E. (n=5)

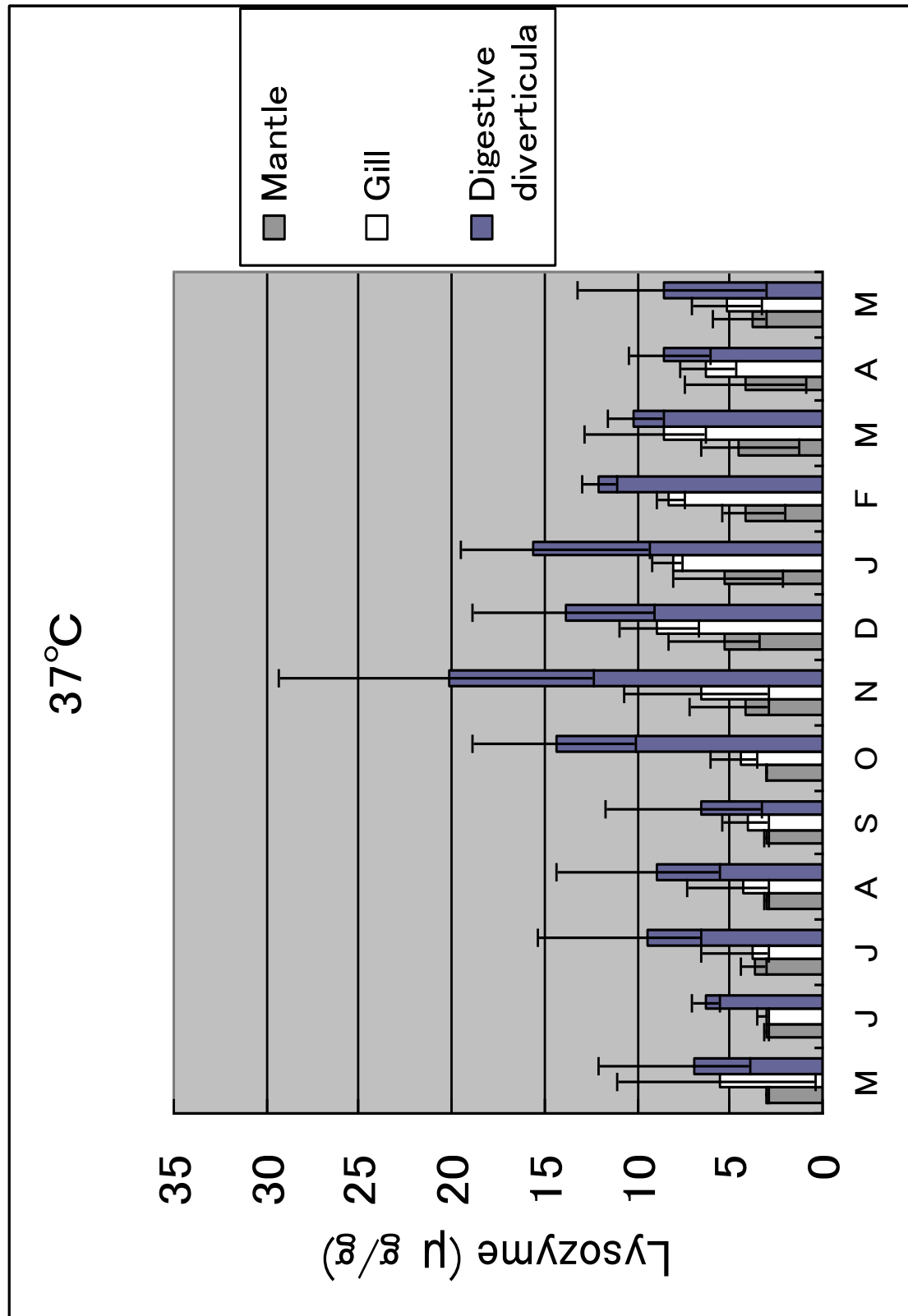


Fig.3 Seasonal changes in lysozyme activity measured at 37°C in the mantle, gill, and digestive diverticula from *M. galloprovincialis* in May, 2005 to May, 2006. Each value shows the mean \pm S.E. (n=5)

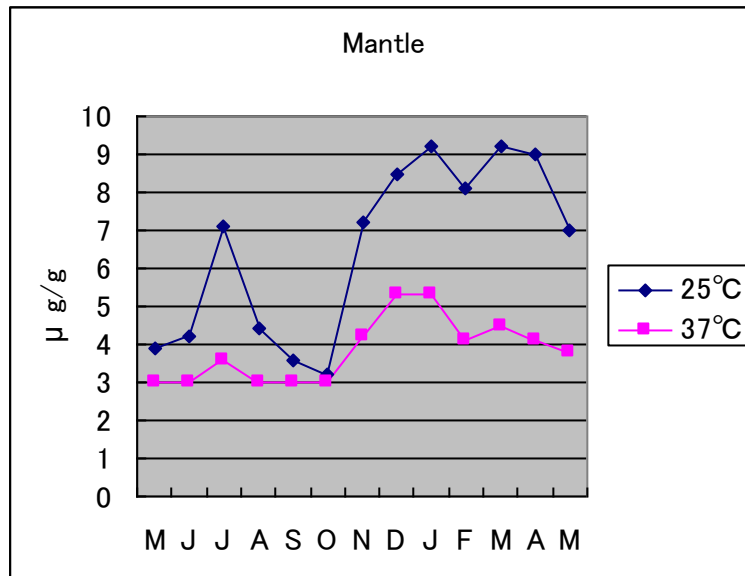


Fig.4a

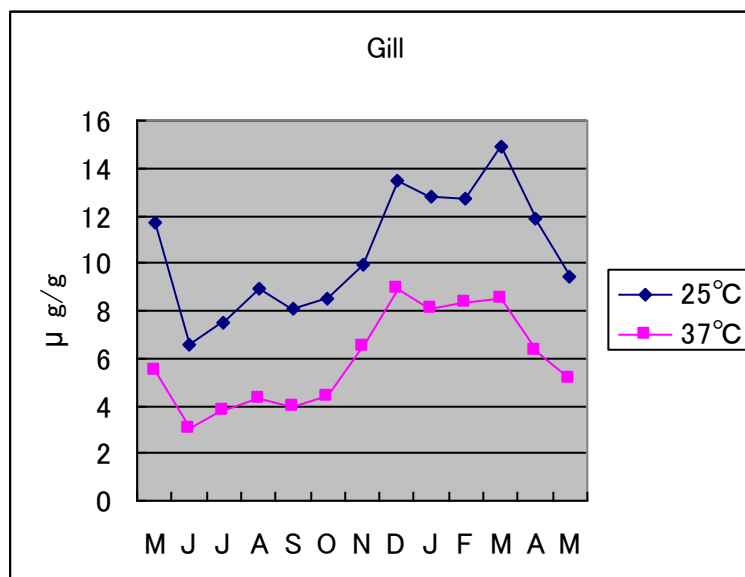


Fig.4b

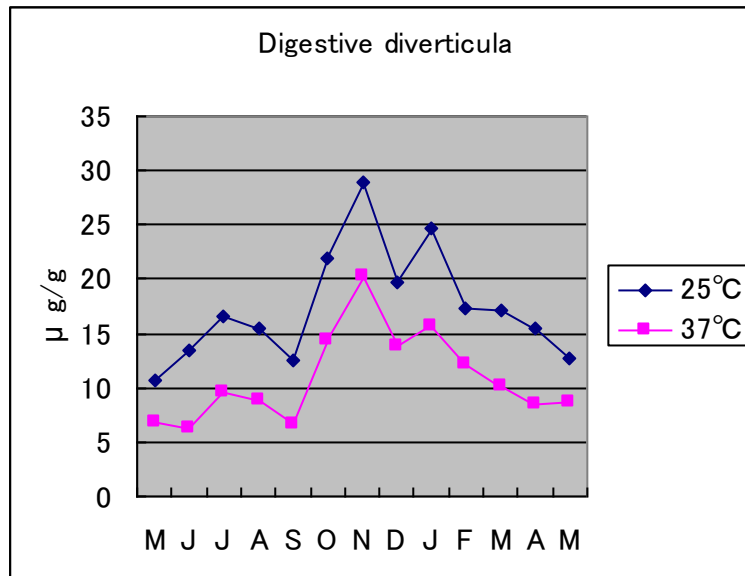


Fig.4c

Fig.4a~c Seasonal changes in lysozyme activity measured at 25°C and 37°C in the mantle(4a), gill(4b), and digestive diverticula(4c) from *M. galloprovincialis* in May, 2005 to May, 2006.

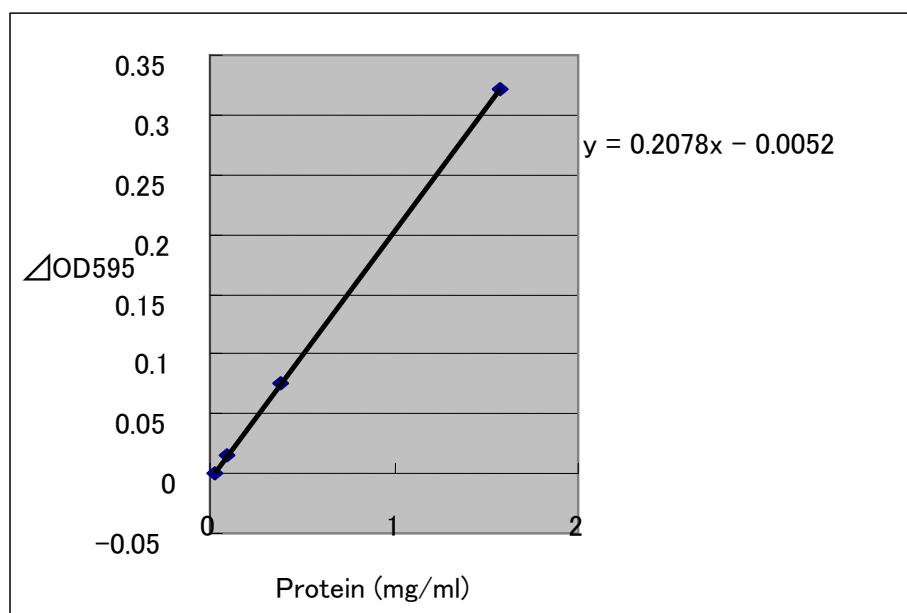


Fig.5 Standard curve for measurement of protein concentrations by Bradford method. Each value shows the mean \pm S.E. Bovine's γ globulin was used as the standard.

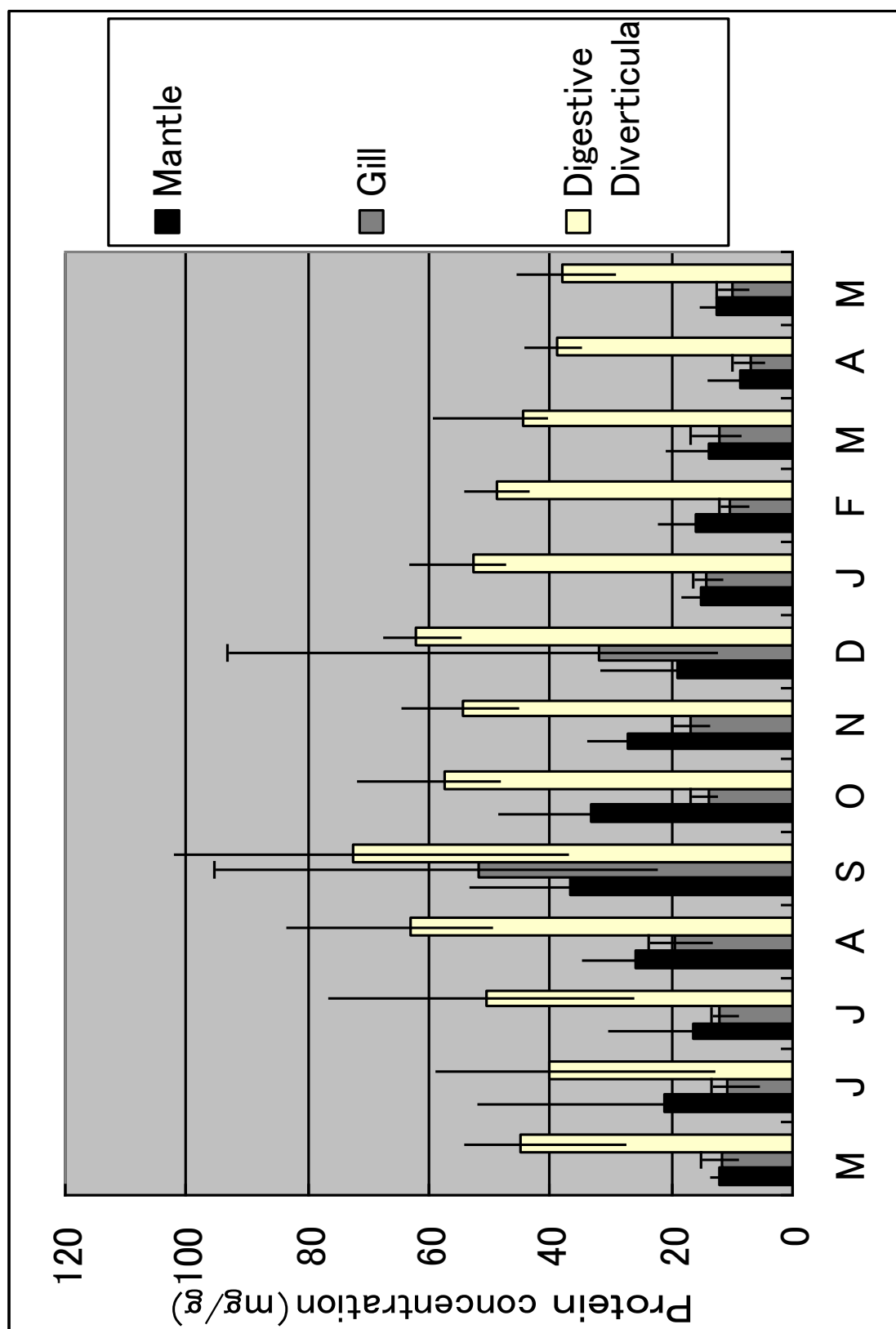


Fig.6 Changes in protein concentration in the mantle, gill, and digestive diverticula from *M. galloprovincialis* in May, 2005 to May, 2006. Each value shows the mean \pm S.E. (n=5)

第3章 ムラサキイガイリゾチームにおける遺伝子の発現

目的

第2章において、ムラサキイガイにおけるリゾチーム活性の有無とその季節変動について検討した。本章ではさらに、リゾチーム遺伝子が活性の認められたそれぞれの組織において、どの細胞、どの部位で発現しているのかを調べるため、外套膜および消化盲嚢の2組織を対象としてリゾチーム遺伝子の mRNA に特異的なプローブを用いて *in situ hybridization* を行った。

第1節においてリゾチーム遺伝子の mRNA の発現が観察された外套膜の血球と消化盲嚢の *digestive cell* において、のリゾチーム遺伝子 (MGL-1、MGL-2) がそれぞれどの程度発現しているのかを調査するため、定量 PCR である Real-time PCR を行なった。

第1節 in situ hybridization を用いた外套膜および消化盲囊

におけるリゾチーム遺伝子発現部位の検討

材料と方法

実験材料

2006年11月～2007年10月までに宮城県牡鹿郡女川町竹ノ浦地先（最低水温 7.0℃～最高水温 22.3℃）で採取された天然のムラサキイガイ（平均殻高 69.2 mm）を用いた。

実験方法

ムラサキイガイでは、2つのリゾチーム遺伝子 MGL-1 (Bachali et al., 2002) と MGL-2 (伊藤、未発表) の配列が知られている (DDBJ / EMBL / GenBank 国際塩基配列データベースにおける Accession Number はそれぞれ AF334665、AB298451)。それらの配列に基づいて MGL-1、MGL-2 それぞれに特異的な RNA プローブを作製した (Table 1)。

In situ hybridization

実験手法は Xue et al. (2007) に準拠しながら一部を改変して以下のように行なった。

固定

ムラサキイガイをサンプリングした後、すぐに殻を剥き、Davidson's 固定液に入れて 4℃で振とうしながら 1～2 日間固定した。その後、常法に従って包埋し、パラフィンブロックにして保存した。今回用いた Davidson's 固定液の組成は、37～40%ホルムアルデヒド (200ml)、95%エタノール (300ml)、酢酸 (100ml)、等張人工海水 (300ml)、グリセリン (100ml) である。

脱パラフィン

常法に従い、厚さ 6 μ m の組織切片を作製した。切片を 60℃のホットプレートの上で 1 時間加熱し、切片が熱いうちにキシレンに 10 分間、さらに新しいキシレンに替えて 10 分間浸した。100%エタノール (2 回)、90%エタノール (2 回)、70%エタノール、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (0.1 M NaCl, 10 mM リン酸ナトリウム, pH 7.4) (2 回) の順で浸漬し、脱パラフィンを行った。浸漬時間はいずれも 5 分とした。

hybridization

パラフィン切片の mRNA とプローブの結合をより高めるための前処理として、HistoVT One（免疫化学研究用抗原賦活液、ナカライテスク）を RNase-free water で 10 倍希釈し、そこに切片を浸して 80~100℃で 40 分間加熱し、室温で冷却後 PBS に 10 分間浸した。続いて順に、0.15%の Triton X-100/PBS に 10 分間、PBS に 10 分間、2X SSC に 10 分間浸した。プローブを含まない hybridization buffer（20X SSC 5 ml、50X Denhardt's solution 500 μ l、0.5M EDTA 100 μ l、Dextran sulfate 2.5 g、Formamide 12.5 ml、RNase-free water 5.5 ml、Denatured herring sperm DNA 50 μ l(10 mg/ml)、Yeast tRNA 50 μ l(10 mg/ml)) を用いて 45℃で 60 分~90 分間の pre-hybridization を行った後、RNA プローブ（MGL-1、MGL-2 のアンチセンスプローブ）をそれぞれ加えて 45℃で一晩の hybridization を行った。陰性対照には、MGL-1、MGL-2 それぞれのセンスプローブを用いた。

hybridization buffer は、20X SSC 5 ml、50X Denhardt's solution 500 μ l、0.5M EDTA 100 μ l、Dextran sulfate 2.5 g、Formamide 12.5 ml、RNase-free water 5.5 ml を順に混ぜ vortex して -20℃で保存し、使用直前に Denatured herring sperm DNA 50 μ l(10 mg/ml)、Yeast tRNA 50 μ l(10 mg/ml)) を加えて hybridization buffer とした。

発色

Hybridization 反応終了後、2X SSC、1X SSC、0.1X SSC でそれぞれ 2 回ずつ洗浄し、Buffer 1（1M Tris-HCl pH 7.6 50 ml、5M NaCl 15 ml、DW 435 ml）に 5 分間、Blocking solution（Blocking reagent（Roche DIG detection kit）100 mg、Buffer 1 10 ml）を添加し 30 分間置き、anti-body solution（Blocking solution 5 ml、Anti-DIG antibody（Roche DIG detection kit）10 μ l）を添加し 2 時間置いた。続いて、Buffer 1 で 15 分間洗浄、Buffer 2（1M Tris-HCl pH 9.6 50 ml、5M NaCl 10 ml、1M MgCl₂ 25 ml、DW 415 ml を混合した後 0.22 μ m フィルターで濾過滅菌）で 5 分間洗浄し、NBT/BCIP（NBT/BCIP stock(Roche DIG detection kit) 200 μ l、Buffer 2 10 ml）を加えて発色させた。

対比染色

1%のビスマルクブラウン（Wako）を用いて対比染色を行った。

観察

観察は、光学顕微鏡を用いて行い、陽性反応の有無を確認した。陽性反応が見られた場合、それがどの細胞なのかを知るため、普通染色（ヘマトキシリン-エオシン染色（H&E 染色））を施した切片と比較しながら細胞・部位の特定を行った。普通染色に用いた切片は、サンプルと連続した切片を用いた。

結果

今回は2006年11月から2007年10月までの一年間の試料を用いて *in situ* hybridization を行ったが、明確な陽性反応を示す試料がなかなか得られなかった。結果として、明確な陽性反応が確認できたものは、MGL-1 においては2007年2月の外套膜サンプル2個体において、MGL-2 においては2007年2月の消化盲囊サンプル1個体で確認できた。

外套膜のサンプルでは、外套膜の結合組織の間のリンパ様組織において MGL-1 遺伝子の陽性反応が確認された。その中で、反応の確認された部位は浸潤した血球が集積しているような部位であり、血球が外套膜におけるリゾチームの発現部位であることが確認された。

消化盲囊のサンプルでは、盲囊細胞の basophil cell において MGL-2 遺伝子の陽性反応が確認され、basophil cell が消化盲囊におけるリゾチームの発現細胞であることが確認された。主導管や2次導管などの導管部や、盲囊細胞においても digestive cell の方に陽性反応は認められなかった。

第2節 血球および消化盲嚢における Real-time PCR による

リゾチーム遺伝子発現量の測定

材料と方法

実験材料

2007 年 7 月～2007 年 10 月までの間に宮城県牡鹿郡女川町竹ノ浦地先（最低水温 20℃～最高水温 22.5℃）で採取された天然のムラサキイガイ（平均殻高 69.2 mm）を材料とし、毎月 10 個体採取した。ツベルクリンシリンジ（26G×1/2 inch）で閉殻筋より血リンパを採取し、遠心分離を行い（7000×g, 4℃, 5 分間）、血球と血漿を分離し、消化盲嚢は軟体部より 5mm 角程度の大きさのものを摘出した。血球と消化盲嚢小片をそれぞれ RNeasy Lateral (Ambion) に入れて、-20℃で凍結保存した。

実験方法

RNeasy Mini Kit (QIAGEN) のプロトコルに従い、以下の方法で行った。

RNA 抽出

消化盲嚢は、RNeasy Lateral につけておいたサンプルを取り出し、シャーレ上で解剖用メスとピンセットを用いて細かく刻んだ。500ml エッペンチューブにサンプルを移し、Buffer RLT を 300 μ l 入れ、ホモジェナイザー用ペッスル（1.5 ml 用）でホモジェナイズした。血球は保存用 RNeasy Lateral を取り出した後、Buffer RLT 300 μ l を入れ、消化盲嚢と同様にホモジェナイザー用ペッスルでホモジェナイズした。ホモジェナイズ後は full speed で 3 分間遠心分離し、上清のみを集めた。上清に 70%エタノールを 300 μ l 加えてピペッティングし、全液を 2 ml スピニングカラムに移し、8000×g、20℃、15 秒で遠心分離した。カラムを通過した液を捨て、カラムに 350 μ l Buffer RW1 を加えて 8000×g で 15 秒間遠心分離し、カラムを通過した液を捨てた。DNase 1 stock と 70 μ l Buffer RDD を混ぜ、短く遠心分離にかけ、その後スピニングカラムの膜上に直接入れ、常温で 15 分間置いた。RW1 を 350 μ l 加え、8000×g で 15 秒間遠心分離してカラムを通過し液を捨てた。500 μ l Buffer RPE を加え、8000×g で 15 秒間遠心分離し、カラムを通過した液を捨て、もう一度同じ作業を行なった。カラムを新しい 2 ml チューブに替え、full speed で 1 分間遠心分離した。新しい 1.5 ml チューブに替え、RNase-free water をカラムの膜上に直接加え（血球で 30 μ l、消化盲嚢で 50 μ l）、8000×g で 15 秒間遠心分離し、RNA を抽出した。血球のみ、RNA 濃度を上げるため、解け出た液

をカラムの膜上に直接加えて同じ作業を2回行った。抽出したRNAは氷上に保存して引き続き実験に用るか、すぐに使用しない時は -30°C で保存した。

RNA 濃度測定

抽出したRNAの濃度を測定するため、 $300\text{ }\mu\text{l}$ エッペンチューブにRNase-free water で10倍希釈のRNA液を作り、Gene Quant II (Pharmacia) でRNA濃度を測定した。

cDNA 作製

得られたRNAをもとに、血球・消化盲囊それぞれのcDNAを作製した。作製には、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いた。

濃度測定後に $20\text{ ng}/\mu\text{l}$ にRNA濃度を調整し、 $150\text{ }\mu\text{l}$ エッペンチューブに $10\text{ }\mu\text{l}$ ずつ各サンプルを分注し、そこに $10\times$ Reverse Transcription Buffer ($2\text{ }\mu\text{l}$)、 $25\times$ dNTPs ($0.8\text{ }\mu\text{l}$)、 $10\times$ Random Primers ($2\text{ }\mu\text{l}$)、Multiscribe Reverse Transcriptase ($1\text{ }\mu\text{l}$)、RNase Inhibitor ($1\text{ }\mu\text{l}$)、Nuclease-free H_2O ($3.2\text{ }\mu\text{l}$) を加えた。作業は全て氷上で行なった。Real-time PCR用にセッティングしたサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700) で転写反応を行い、cDNAを作製した。作製したcDNAは -30°C で保存した。

Real-time PCR

Real-time PCRは以下の手順で行った。作製したcDNAをDWで10倍希釈した。PCR Master Mix ($12.5\text{ }\mu\text{l}$)、 $5\text{ }\mu\text{M}$ プライマー (ForwardとReverseをそれぞれ $0.25\text{ }\mu\text{l}$ ずつ)、DW ($9.5\text{ }\mu\text{l}$) を混合してpre-mixを作製した。クリーンベンチ内で96 Wellプレートにpre-mixを分注し、そこにcDNAを $2.5\text{ }\mu\text{l}$ ずつ分注した。分注後プレートをシールし、遠心分離 ($35000\times g$ 、10秒間) にかけた。7300 Real Time PCR System (ABI) にプレートを装着し、 50°C で2分間、 95°C で10分間反応の後、 95°C で15秒間と 60°C で1分間の2セットを40サイクル繰り返した。ネガティブコントロールとしてDWを使用し、血球と消化盲囊のcDNAでそれぞれ5段階で濃度調整したものを用意し、増幅効率を算出するための標準曲線作成用サンプルとして使用した。また、ムラサキイガいの18S RNA遺伝子 (GenBank Accession Number L33452) を、サンプルのリゾチーム遺伝子の発現を相対的に示す内部標準遺伝子として使用した。

遺伝子発現量の算出法

Itoh et al. (2007) に従い、以下の方法で遺伝子発現量を算出した。

$$\text{遺伝子発現量} = (1 + E_R)^{CtR} / (1 + E_T)^{CtE}$$

E_R と E_T はそれぞれ、内部標準遺伝子とターゲット遺伝子の増幅効率、 CtR と CtE は内部標準遺伝子とターゲット遺伝子の閾値サイクル数である。

増幅効率 = $10^{-1/\text{標準曲線の傾き}}$

標準曲線は、標準曲線作成用サンプルの濃度 (1、0.2、0.04、0.008、0.0016) を対数表示したものとそれぞれの閾値サイクル数で算出した。(Fig.10, 11)

結果

血球においては、MGL-1 遺伝子が検出され、その量的変動をみると 7 月から 8 月にかけて増加し、相対発現量はほぼ 2 倍となった。その後は減少に転じて、10 月まで漸減した。消化盲嚢では MGL-2 遺伝子が検出され、相対発現量は 7 月から 8 月にかけてはほぼ 2 倍に増加し、9 月にはさらに 2 倍も増加した後、10 月には減少した。

全体的に見ると、MGL-1 は増減のあるものの全体的に緩やかで安定的であるが、MGL-2 は増減の傾斜が急であり最大で 4 倍の増加が見られるなど、季節によって発現量が大きく変わっていた。

考察

第2章に示したように、今回測定したムラサキイガイの3つの組織、すなわち消化盲嚢、鰓、外套膜では変動はあるものの、常に高いリゾチーム活性が検出された。そこで、これらの組織でみられるリゾチームはどの組織で、あるいはどの細胞で産生されているのかを明らかにすることを考えた。また、第2章でも触れたようにヨーロッパイガイ (Olsen et al., 2003) やバージニアガキ (Xue et al., 2007; Itoh et al., 2007) において同種に複数のリゾチーム分子 (遺伝子) が存在することがわかっている。そこで、本研究で対象としたムラサキイガイの3つの組織においても同じリゾチーム分子が存在しているのか、それとも異なるのかについても明らかにすることを試みた。材料と方法の項で述べたように、ムラサキイガイでは2種類のリゾチーム遺伝子 (MGL-1、MGL-2) が報告されている (Bachali et al., 2002; 伊藤、未発表)。2つの遺伝子の配列には大きく異なる部分があることを利用して、MGL-1、MGL-2に特異的なRNAプローブを作製し、リゾチーム遺伝子の発現の違いを調べることにした。

第1節の結果、今回実験に用いたムラサキイガイの外套膜と消化盲嚢のサンプルにおいて、外套膜ではMGL-1リゾチーム遺伝子の発現が、消化盲嚢ではMGL-2リゾチーム遺伝子の発現が認められた。それぞれの組織を詳細に観察した結果、外套膜では間質結合組織の間に浸潤している血球で、消化盲嚢では盲嚢細管 (digestive tubule) を構成する2種類の細胞のうち basophil cell で特異的にリゾチーム遺伝子が発現していた。今回の観察では、外套膜、消化盲嚢ともに1種類のリゾチーム遺伝子だけが発現し、しかもその遺伝子は異なっていた。この結果は、バージニアガキにおけるリゾチーム遺伝子の発現とよく似ていた (Xue et al., 2007; Itoh et al., 2007)。すなわち、ムラサキイガイの外套膜および消化盲嚢のリゾチームは、活性の高さや消長が異なるのではなく、発現している分子そのものが異なっていると考えられた。そして、その分子の違いは2つの組織におけるリゾチームの役割の違いと関係していることが示唆された。また、Matsumono et al. (2006) は、マガキにおいて外套膜・鰓・閉殻筋・生殖巣・消化盲嚢・血球の6つの組織でのリゾチーム遺伝子の発現を調べ、閉殻筋を除く5つの組織で遺伝子が発現していると報告している。これらの遺伝子発現がみられた (あるいはみられなかった) 組織は高橋ら (1986) でリゾチーム活性が認められた (あるいは認められなかった) 組織とほぼ一致している。すなわち、マガキの各組織に見られるリゾチーム分子は、それらの組織自身で遺伝子の発現、タンパク分子の産生が行われていると考えられる。ムラサキイガイにおいても同様であるならば、外套膜と消化盲嚢とでは、異なるリゾチーム分子を持っている可能性がとても高いと言える。

しかし、本研究では、1年間に渡って毎回1回ずつ試料を採取してリゾチーム遺伝子の検出を試みたが、検出できたのは2007年2月のサンプルのみであった。前年のデータではあるが、リゾチーム活性としてみた場合、外套膜、消化盲嚢ともにすべての月で検出されている。従って、今回の *in situ hybridization* によるリゾチーム遺伝子の検出が限られた月にしかできなかったことについては、本当に発現していないのか、手法上の問題なのか明確ではない。今後の検討課題としたい。

Real-time PCR によってムラサキイガイ血球と消化盲嚢試料からリゾチーム遺伝子が検出・定量できた。血球からは MGL-1 が、一方の消化盲嚢からは MGL-2 が検出された。先にみた *in situ hybridization* の結果で、外套膜で検出された MGL-1 は外套膜に浸潤した血球に局在すると考えたが、Real-time PCR の結果から、血リンパの浮遊血球も MGL-1 のみを持つことが明らかとなった。2007年7月から10月までの試料を用いて、遺伝子量の変動を調べた結果、特に消化盲嚢における MGL-2 の発現が大きな変動を示した。9月が最も高く、相対発現量で7月の値の4倍程度の大きさであった。前年に調べたリゾチーム活性では、むしろ7月の方が高い傾向にあったので、遺伝子量と活性の変動については、もう少し詳細に検討する必要がある。

Table 1

Primers used in lysozyme cDNA cloning, Real-time PCR and in situ hybridization.

Primer	Usage	Direction	Sequence
MGL-1	in situ hybridization	Forward	5'-GCA ACA ACA ATA TAG GAT GCC G-3'
MGL-1	in situ hybridization	Reverse	5'-ATG GTG TTA GGG TTT GTG CAT C-3'
MGL-2	in situ hybridization	Forward	5'-AGC GTA ATC GTA GCC ACT G-3'
MGL-2	in situ hybridization	Reverse	5'-CAA TCG AGT GGT CTG CAA C-3'
MGL-1	Rea-time PCR	Forward	5'-TGT GGA CAA CCA AAA GGA GAC TAC-3'
MGL-1	Rea-time PCR	Reverse	5'-CCT CGC CAT ATA AGT CTC AAT ACA GTT-3'
MGL-2	Rea-time PCR	Forward	5'-GGA CAG CAA AAT GGT CGG ATA-3'
MGL-2	Rea-time PCR	Reverse	5'-TGC TAC CAG TAA CAC AGA CAC ATG A-3'
18S	Rea-time PCR	Forward	5'-TCC CAG TAA GCG CGA GTC AT-3'
18S	Rea-time PCR	Reverse	5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAA G-3'

BASE COUNT	213 a	108 c	141 g	178 t
------------	-------	-------	-------	-------

ORIGIN

```

1 cctcctttaa gatccatgat gactgagctc aaaatgtctg tcgcactatt cttcgcatg
61 ctttgccggac tgaatgtttg ttgcggactg aaggaaattg tggaatccta taaagtggaa
121 tttgaacaac gtgaagtaga tgtggaatct gaaggacttg tttctggtga tttaaataaa
181 tctaattggac ttgtctctga taaatgcatg agatgtatct gcatggtaga gtctcattgc
241 aacaacaata taggatgccg aatggatggt gggtctttgt catgtggacc attccaaatt
301 aaaaaggcat attggatcga ctgtggacaa ccaaaaggag actacaaggc atgcgccaac
361 gactatgcat gtgcctataa ctgtattgag acttatatgg cgagggtacat tggtcacagt
421 ggatgtccaa agggttgtga aagctatgct cgtatccaca atggcggtcc aagaggatgc
481 acaaacccta acaccattgg atactggaac aaaattaaac agcagggctg cacgatttat
541 agttaagcc tctggacata tagattacat gtacatgttt aaacataacg caaaatgatt
601 tttaaactt taaaagactt gaattaaaaa aaaaaaaaaa
//

```

Fig.7a

Complete cDNA sequence of MGL-1 in the *Mytilus galloprovincialis*. Nucleotides are numbered on the left from the first base of the cDNA. The start and stop codons are boxed and in situ hybridization-primers are underlined and PCR-primers are underlined twice.

BASE COUNT	255 a	142 c	169 g	194 t
------------	-------	-------	-------	-------

ORIGIN

```

1 attagaacaa aggacagcaa atggtcgga tttttctga tattaagcgt aatcgtagcc
61 actgctagag ccaacatctc tggtcacatt gcaacaggat catgtgtctg tgttactggt
121 agcacggtta atgcacgaca tacagccagt atacatggtc atatagtagg aacggtacat
181 tctggtgaat gttataaata caatggacac atgcacactg cagacggata cacgtggtat
241 caacttcaac acgtacatgg acagctagcg tatgtcgctg gaagtttact gcagacatca
301 acagcatccc attgcagtgt atcaacacac agtggaactt ttgcaacagg agttgtttcc
361 gataagtgtg tgcagtgtat ttgtgatttg gaatccggtt gcagaccact cgattgcaaa
421 tgggacgtaa attcgaactc ttgtggatac atgcaaataa aacaggttta ctgggatgac
481 tgtggaaaac caggcggaag cttagaagca tgtccaaag ataaacattg tgcttctcag
541 tgtgtccaaa aatatatgtc taggtacatc aatcattatg gatgcgcaca taattgtgag
601 agttatgccc gaatgcacaa tggaggacca gcagggtgca aacacactaa tactttgggt
661 tactggagcc atattcagag ccagggatgc agtgcaaaca gtaaactgt atttccaca
721 aataaaatag ttgtatttga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
//

```

Fig.7b

Complete cDNA sequence of MGL-2 in the *Mytilus galloprovincialis*. Nucleotides are numbered on the left from the first base of the cDNA. The start and stop codons are boxed and in situ hybridization-primers are underlined and PCR-primers are underlined twice.

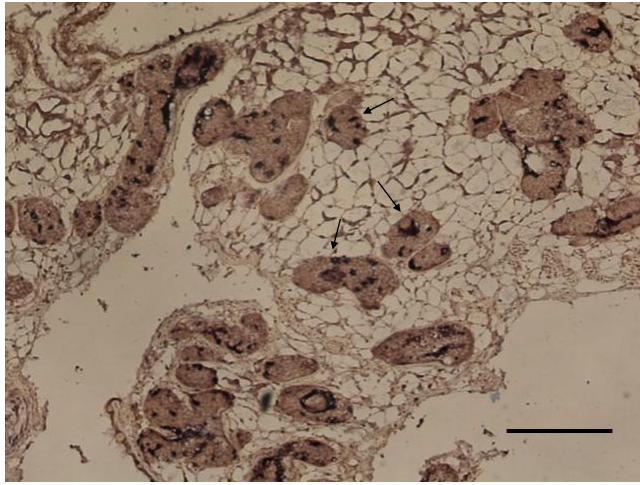


Fig.8a

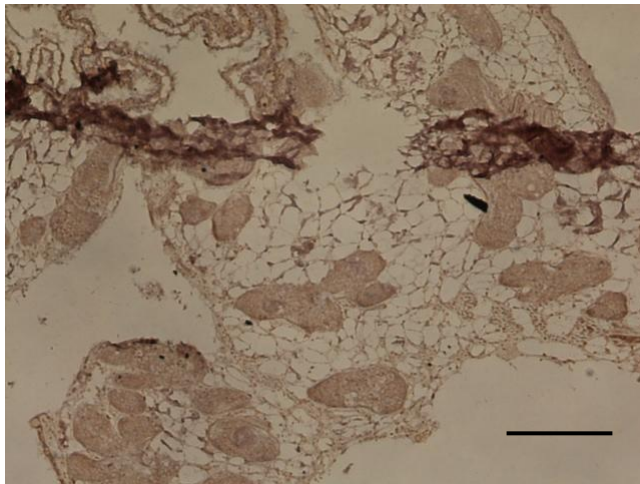


Fig.8b

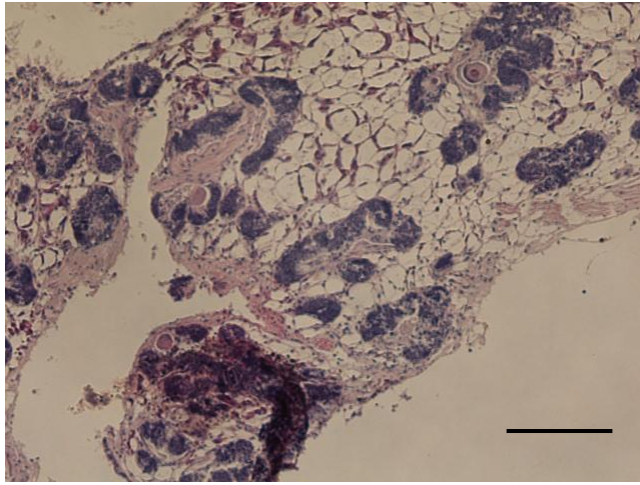


Fig.8c

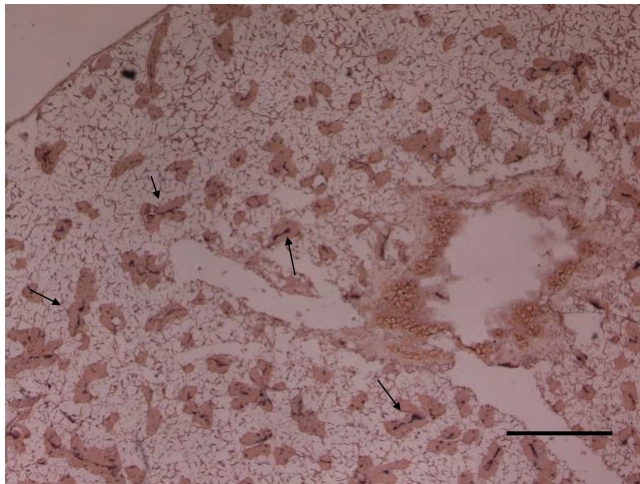


Fig.9a

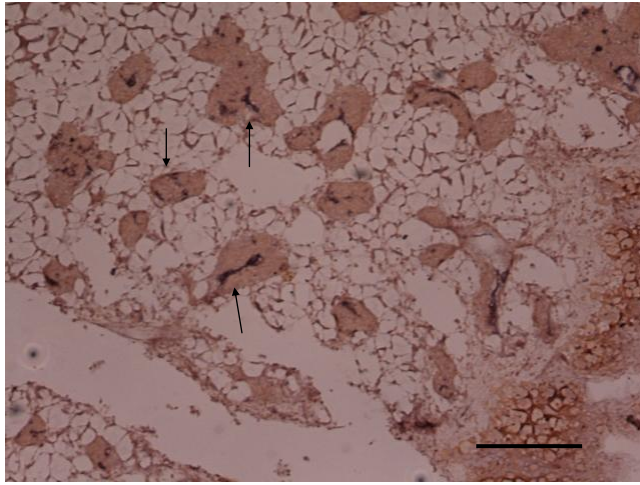


Fig.9b

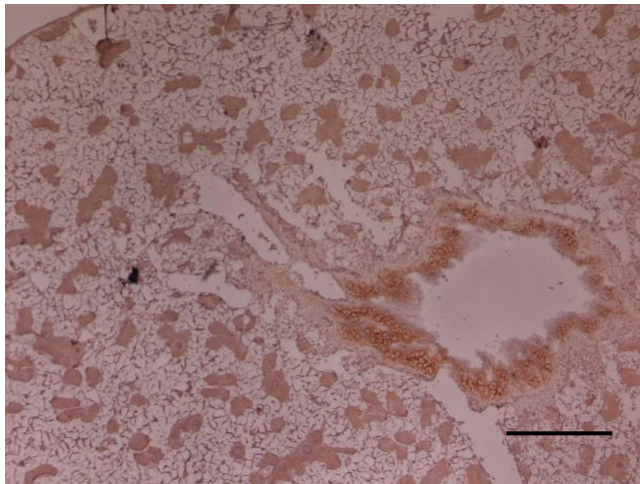


Fig.9c

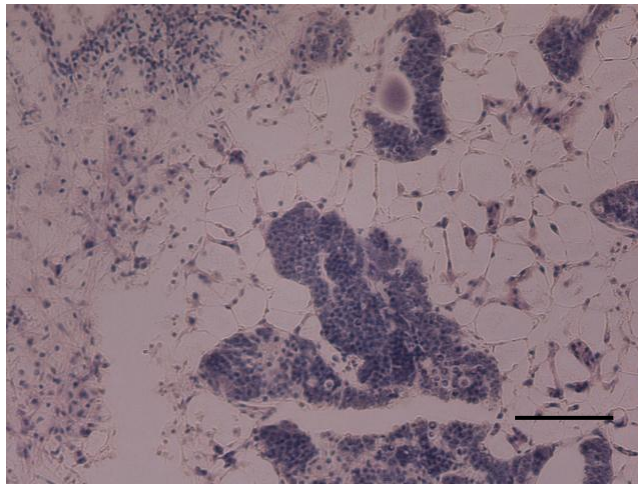


Fig.9d

Fig.8a~8b

Localization of lysozyme-mRNA in mantle of *Mytilus galloprovincialis* by in situ hybridization. Tissue sections hybridized with MGL-1 antisense probe(8a). 8b was hybridized with MGL-1 sense probe. A continuous section was stained with hematoxylin and eosin(H&E)(8c). Scale bars indicate 200 μ m in a, b, and c.

Fig.9a~9d

Localization of lysozyme-mRNA in mantle of *Mytilus galloprovincialis* by in situ hybridization. Tissue sections hybridized with MGL-1 antisense probe(9a&9b). 9c was hybridized with MGL-1 sense probe. A continuous section was stained with hematoxylin and eosin(H&E)(9d). Scale bars indicate 200 μ m in a and c, 100 μ m in b, 50 μ m in d.

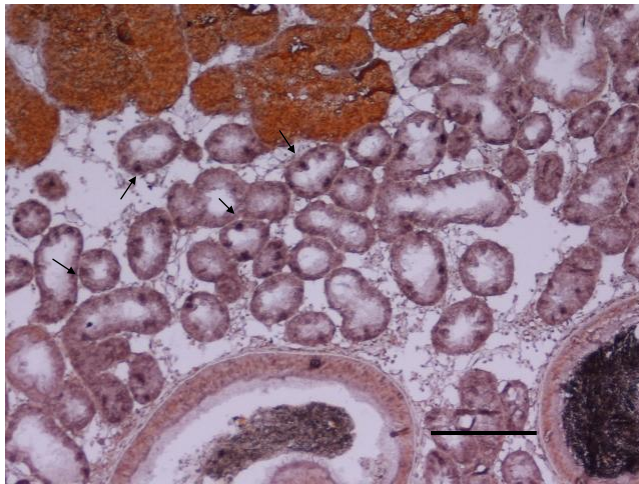


Fig.10a

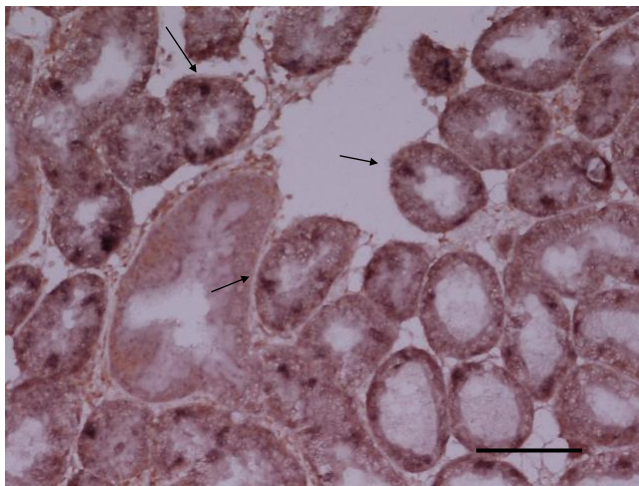


Fig.10b

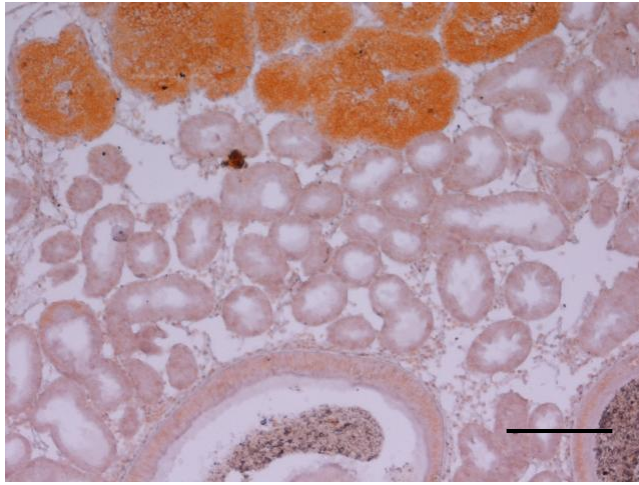


Fig.10c

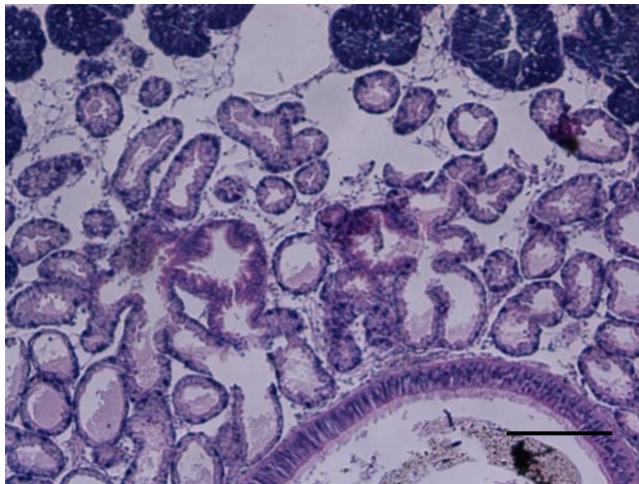


Fig.10d

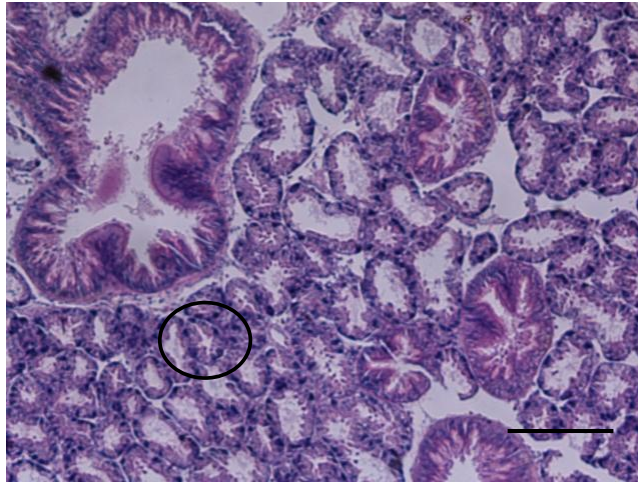


Fig.10e

Fig.10a~10e

Localization of lysozyme-mRNA in digestive diverticula of *Mytilus galloprovincialis* by in situ hybridization. Tissue sections hybridized with MGL-2 antisense probe(10a&10b). 10c was hybridized with MGL-1 sense probe. A continuous section was stained with hematoxylin and eosin(H&E)(10d&10e).

Scale bars indicate 200 μ m in a, c, d, and e, 100 μ m in b.

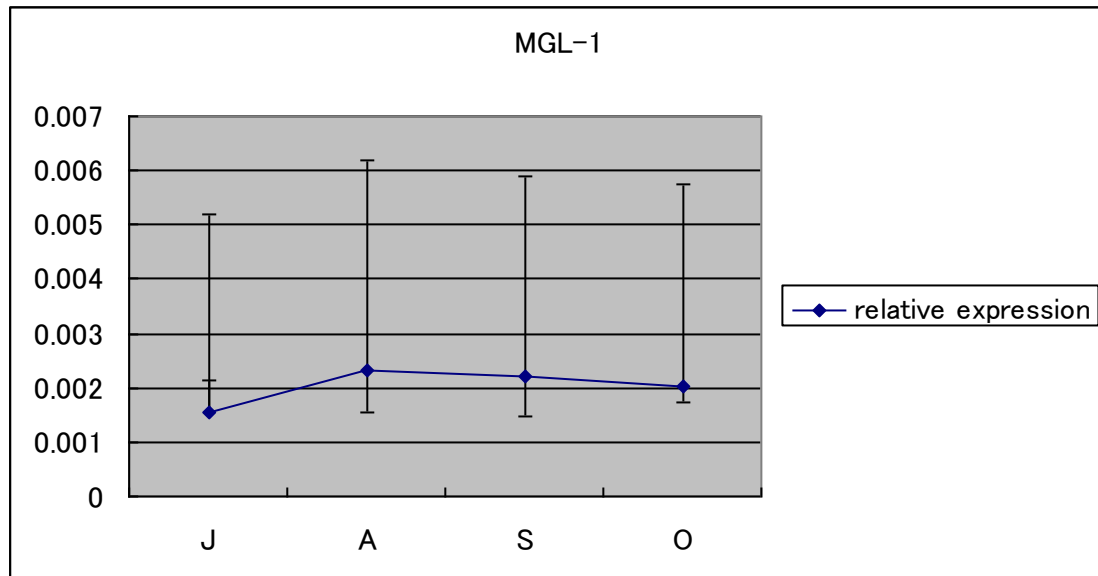


Fig.11a

Relative expression of MGL-1 in hemolymph of *Mytilus galloprovincialis*. Each value shows the mean \pm S.D.

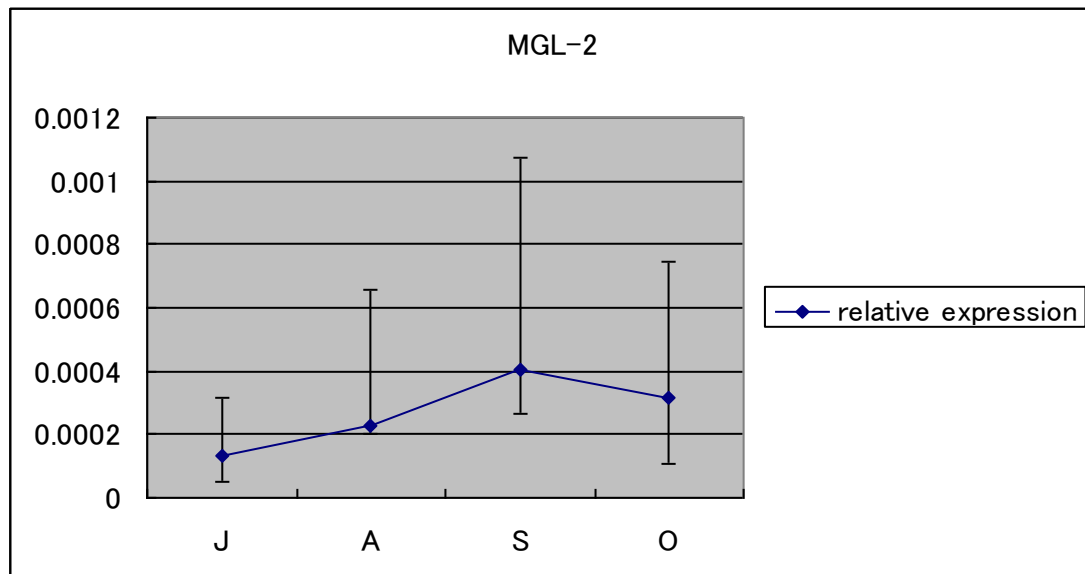


Fig.11b

Relative expression of MGL-2 in digestive diverticula of *Mytilus galloprovincialis*. Each value shows the mean \pm S.D.

要約

ムラサキイガイにおけるリゾチーム活性の季節変動について、25℃と 37℃の 2 温度において、外套膜、鰓、および消化盲囊の 3 つの組織を対象に調査したところ、どの組織も 25℃の方で活性が高かった。また、活性は消化盲囊で最も高く、次いで鰓で高く、外套膜で最も低かった。変動傾向は、全体的に秋の終わりから春のはじめにかけて高くなっているが、消化盲囊では冬に活性が低下するのに対し、外套膜、鰓では活性が高くなっており、組織における活性の違いが見られた。

リゾチーム活性の季節変動と同時期の組織におけるタンパク濃度の季節変動を調査したところ、タンパク濃度とリゾチーム活性の変動は一致しなかった。タンパク濃度中でリゾチームが占める割合はとても小さいものであり、リゾチームの変動が全体に与える影響は小さいものと考えられた。

リゾチーム活性の見られた組織（外套膜と消化盲囊）において、mRNA を特異的にプローブする *in situ hybridization* をムラサキイガイの 2 種類のリゾチーム遺伝子 (MGL-1、MGL-2) を用いて行ったところ、外套膜においては MGL-1 が、消化盲囊においては MGL-2 が特異的に反応し、それぞれの組織におけるリゾチーム発現細胞は、外套膜では間質結合組織の間に浸潤している血球、消化盲囊では盲囊細管 (digestive tubule) を構成する 2 種類の細胞のうち basophil cell であることがわかった。

血球と消化盲囊において、MGL-1 と MGL-2 がそれぞれどの程度発現しているのかを定量するために、Real-time PCR を行った。リゾチーム活性と発現量の変動について必ずしも一致しているとは言えず、更なる検討が必要である。

謝辞

本研究を推進するにあたり、指導教員として終始適切な御助言を下さり、本論文の作成に関して御指導して下さった東北大学大学院農学研究科の高橋計介准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において重要な御助言を下さり、研究過程においても丁寧に御指導下さった本学研究科の伊藤直樹助教に厚く感謝致します。

そして、本研究一年目に御助言、御指導を下された本学研究科の室賀清邦元教授（現広島大学名誉教授）を始め、副指導教員の本学研究科の鈴木徹教授、実験を行う上でお世話になった本学農学研究科附属複合生態フィールド教育センターの皆様に感謝申し上げます。

最後に、本研究は本学研究科水圏動物生理学分野の皆様の御助言、御協力のもと進めることができました。厚く感謝申し上げます。

参考文献

- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jolle's, P., Fiala-Medioni, A., Deutsch, J.S., 2002. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozyme and the evolution of lysozyme function. *J. Mol. Evol.* 54, 652-664.
- Cronin. M.A., Culloty. S.C., Mulcahy. M.F., 2001. Lysozyme activity and protein concentration in the hemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis*(L.). *Fish and shellfish immunology.* 11, 611-622.
- Chu, F.-L.E., 2000. Defense mechanism of marine bivalves. In: Fingerma, M., Nagabhushanam, R., (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology. Immunobiology and Pathology*, vol. 5. Science Publishers Inc, Enfield, NH, pp, 1-42.
- Chu. F.-L.E., La Peyre. J.F., 1989. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters(*Crassostrea Virginica*). *J. Invertebr. Pathol.* 54, 224-232.
- Ishikawa H. Keisuke T. Mori K., 1997. Occurrence of bactericidal factor in the tissues of the Japanese Rock Oyster, *Crassostrea nippona*. *SUISANZOUSHOKU*, 45, 4, 505-511.
- Itoh, N., Takahashi, G.K., 2007. cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 148, 160-166.
- Itoh, N., Xue. Q.G., Li. Y., Cooper. R.K., La Peyre. J.F., 2007. cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish Shellfish Immunol*, 23, 957-968.
- Jolle, P., Jolles, J., 1984. What's new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.* 63, 165-189.
- McHenery, J.G., Allen, J.A., Birkbeck, T.H., 1986. Distribution of lysozyme-like activity in 30 bivalve species. *Comp. Biochem. Physiol. B* 85, 581-584.

- Matsumoto, T., Nakamura, M.A., Takahashi, G.K., 2006. Cloning of cDNA and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Comp. Biochem. Physiol. B 145, 325-330.
- Nilsen, I.W., Overbo, K., Sandsdalen, E., Sandaker, E., Sletten, K., Bjornar, M., 1999. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. FEBS Lett. 464, 153-158.
- Olsen, M., Nilsen, I.W., Sletten, K., Myrnes, B., 2003. Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). Comp. Biochem. Physiol. B 136, 107-115.
- 高橋 計介・森 勝義・野村 正：海産二枚貝におけるリゾチームの存在と特性.日本誌.52, 863-868.
- Rodrick, G.E., Cheng, T.C., 1974. Kinetic properties of lysozyme from hemo-lymph of *Crassostrea virginica*. J. Invertebr. Pathol. 24, 41-48.
- Santarem. M.M., Robledo. J.A.F., Figueras. A., 1994. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue messel *Mytilus galloprovincialis*. Dis. Aquat. Org. 18, 217-222.
- Xue, Q.G., Schery, K.L., Volety, A.K., Chu, F.L., La Peyre, J.F., 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Comp. Biochem. Physiol. B 139, 11-25.
- Xue, Q.G., Itoh, N., Schey, K.L., Li, Y.L., Cooper, R.K., La Peyre, J.F., 2007. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. Cell. Mol. Life Sci. 64, 82-95.
- Zavalova, L.L., Yudina, T.G., Artamonova, I.I., Baskova, I.P., 2006. Antibacterial non-glycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and oh its helical amphipathic peptides. Chemotherapy 52, 158-160.